

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 47/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/21298 (43) Date de publication internationale: 29 septembre 1994 (29.09.94)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00296</p> <p>(22) Date de dépôt international: 17 mars 1994 (17.03.94)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 93/03060 17 mars 1993 (17.03.93) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).</p> <p>(71)(72) Déposant et inventeur: SIMPSON, Karl [FR/FR]; Hameau de Bobon, F-07610 Vion (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): CRAINIC, Radu [FR/FR]; 16, parc de Diane, F-78350 Jouy-en-Josas (FR).</p> <p>(74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.; Grosset-Fournier & Demachy SARL, 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: STABILISED PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREPARING SAME</p> <p>(54) Titre: COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES STABILISEES ET LEURS PROCEDES DE PREPARATION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A stabilised pharmaceutical composition containing one or more macromolecules selected from nucleic acids, lipids and carbohydrates, and/or one or more macromolecular complexes. The composition is characterized in that it includes one or more pharmaceutically acceptable carriers of which at least one contains heavy water (D₂O). The composition is suitable for preparing vaccines.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne une composition pharmaceutique stabilisée comprenant une ou plusieurs macromolécule(s) choisie(s) parmi les acides nucléiques, les lipides ou les glucides, et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), l'un au moins de ces véhicules contenant de l'eau lourde (D₂O). Application à la préparation de vaccins.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES STABILISEES ET LEURS PROCEDES DE PREPARATION

La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques stabilisées et leurs procédés de préparation.

La présente invention concerne plus particulièrement la stabilisation d'agents prophylactiques, ou thérapeutiques ou de diagnostic constitués ou contenant des macromolécules ou des complexes macromoléculaires.

L'importance sociale et commerciale des macromolécules biologiques augmente.

La plupart des agents thérapeutiques ou protecteurs agissent dans le milieu aqueux des espaces inter- ou intracellulaires, ou les surfaces muqueuses.

Certains agissent dans le milieu hydrophobique constituant les phases membranaires, lipidiques ou dans l'environnement des acides aminés hydrophobes.

Au cours de ces dernières années, les biotechnologies ont eu des influences considérables dans les industries du secteur de la santé. Les nouveaux procédés pour la fabrication et l'isolement de matériaux macromoléculaires sont capables de réaliser, en quantités commerciales, des produits naturels ou issus du génie génétique, dotés de spécificités précédemment irréalisables. (Virus, ADN, ARN, ribozymes, agents anti-sens, etc...)

Les anciens composés thérapeutiques de poids moléculaires relativement faibles (aspirine, paracétamol, catécholamines, pénicilline) ont été caractérisés par une certaine facilité de formulation dans les comprimés, les émulsions, suspensions ou solutions.

Certaines macromolécules - telles que les acides nucléiques, et leurs complexes avec les protéines (et leurs cofacteurs), les glucides complexes, les lipides - et leurs complexes, deviennent d'un intérêt de plus en plus important en tant que vaccins, ou thérapeutiques ou de diagnostic.

Dans les milieux aqueux, toutes les macromolécules et les complexes macromoléculaires indiqués ci-dessus ont une tendance à la dégradation, ce qui limite leur utilité d'agent thérapeutique, vaccinant ou de diagnostic.

Pour beaucoup d'agents, la dégradation n'est pas un problème sérieux (par exemple, en suivant les indications du fabricant, on évite les problèmes associés éventuellement avec l'utilisation d'un vaccin périmé). Néanmoins, même dans le meilleur des cas, l'augmentation de la durée de vie de l'ordre de 50% à 100% (à

la température de 20 °C) d'un produit thérapeutique, sera la bienvenue (par exemple: le vaccin contre la poliomyélite).

Pour d'autres agents, le stockage sous forme de poudre lyophilisée est tout à fait satisfaisant, la dégradation commençant simplement au moment de l'incorporation dans un milieu aqueux.

Pour plusieurs autres agents, les problèmes de stockage sous forme sèche ne peuvent pas être résolus. Pour certains, stables sous forme sèche, la dégradation en milieu aqueux est tellement rapide que la stabilité présente un problème, même dans la courte période entre l'incorporation en milieu aqueux et l'utilisation.

Il y a plusieurs facteurs causant la dégradation : les procédés de fabrication, les enzymes de dégradation (les enzymes protéolytiques, les nucléases, les lipases, les enzymes glycolytiques), les agents d'oxydation ou de réduction (comme l'oxygène, ou les produits chimiques organiques ou inorganiques), la contamination microbienne.

Les liaisons chimiques faibles sont importantes pour les macromolécules biologiques.

La dénaturation thermique ne peut pas être évitée, en raison des nombreuses liaisons chimiques faibles qui caractérisent les macromolécules biologiques. Néanmoins, cela peut-être limité, par exemple, en gardant les températures relativement basses (réfrigération ou congélation). Parfois, de faibles augmentations de température peuvent produire des changements spectaculaires dans l'activité des agents biologiques. De tels changements impliquent la rupture d'une organisation moléculaire qui dépendent des effets coopératifs non-associés avec la dénaturation spécifique d'une protéine ou d'un acide nucléique spécifique.

Afin de remédier au phénomène de déstabilisation, on peut utiliser des adjuvants tel que $MgCl_2$, (pour le vaccin contre la poliomyélite) le polyéthylène glycol, etc; cependant ceux-ci peuvent présenter l'inconvénient de ne pas toujours (en fonction des concentrations) être physiologiquement appropriés.

Pour chaque température ambiante, il y a un spectre d'énergie disponible pour les changements de structure dans une macromolécule ou dans un complexe macromoléculaire (REF: Watson, James et al. pages 126 à 162, Molecular Biology of the Gene, 4th Edition (1987) Publishers Benjamin Cummings, ISBN 0-8053-9612-8). Dans le pire des cas, ces changements peuvent être associés à la rupture ou à la création de liaisons chimiques covalentes. Les énergies moins importantes seront peut-être suffisantes pour la création ou la rupture des liaisons chimiques secondaires (les liaisons

hydrogène, les interactions hydrophobes, les interactions de Van-der-Waals) qui jouent un rôle important dans les processus biologiques et les activités des macromolécules biologiques. L'importance des liaisons discutées ci-dessous, est la plus prononcée entre les températures de 0°C et 45°C, correspondant à la gamme des températures associées aux processus vivants dans les organismes supérieurs.

Ces interactions faibles sont toutes favorisées par une complémentarité de structure physique. Par exemple, une hormone et son site d'attachement sont liés par plusieurs liaisons faibles. La complémentarité de structure augmente le nombre des interactions du type Van-der-Waals, hydrophobes ou hydrogène, et ainsi évite l'effet disruptif de l'énergie ambiante.

L'eau elle-même joue un rôle important dans la stabilisation des macromolécules en milieu aqueux.

Les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau ordonnent la structure. La structure peut-être mise en évidence avec les techniques de diffraction des rayons-X ou des neutrons.

A la périphérie des macromolécules, des molécules d'eau forment une sorte de couche, d'une profondeur de plusieurs molécules d'eau. Comme une cage, cette couche, renforcée par les liaisons hydrogène - entre des molécules d'eau et entre des molécules d'eau et les macromolécules - a pour effet de préserver l'intégrité du contenu.

La structure électronique de l'eau permet le libre échange des protons (noyaux des atomes d'hydrogène) entre les éléments du treillis d'eau et avec les sites favorables sur les macromolécules en milieu aqueux.

Dans les macromolécules, les molécules d'eau servent souvent de rôle de composant structurel, créant des ponts rigides entre les résidus protéiques, des bases nucléiques, des glucides ou des composants polaires des lipides. Les études cristallographiques montrent clairement l'inclusion des molécules d'eau dans plusieurs cristaux macromoléculaires. L'effet cumulatif coopératif de ces ponts moléculaires dans les structures comme les virus picorna est très sensible aux augmentations de température.

L'eau lourde (ou l'oxyde de deutérium, D₂O ou ²H₂O) a été découverte par Urey en 1932. Cette découverte a précipité un intérêt immédiat, surtout concernant les éventuelles répercussions sur la chimie de la vie. Pendant des années 1932-1939, plus de 200 publications ont montré les effets de l'eau lourde sur les organismes vivants et leurs physiologie et biochimie. Dans tous les cas, D₂O a été utilisée pour remplacer (entre 5% et 100%) H₂O dans les milieux

aqueux, mais les résultats obtenus n'ont pas permis de considérer l'eau lourde comme un agent stabilisateur.

Pendant les années 1970-80, l'eau lourde est devenu un outil important, dans le domaine des études biophysiques, tel que la RMN (résistance magnétique nucléaire) ou la diffusion des neutrons monochromatiques.

Pour la RMN, le noyau de deutérium possède l'atout de ne pas avoir de spin nucléaire. En milieu H_2O , dans un champs magnétique, les signaux de fréquence radio émis par les noyaux excités ne peuvent pas être détectés, parce que tous les hydrogènes de l'eau créent un bruit de fond énorme. Dans le milieu D_2O , l'eau ne contribue pas à un bruit de fond, et la technique de résonance magnétique des protons est devenue très puissante- surtout pour les molécules qui contiennent des protons (1H) et qui sont solubilisées par D_2O .

Les propriétés nucléaires des noyaux H et D sont bien différentes. Pour un faisceau de neutrons, le deutérium est relativement transparent, tandis que l'eau ordinaire est relativement opaque (Stuhrman H. (1974) J. Appl. Cryst. 7, 173-187). Les diverses techniques permettent la différenciation des informations structurelles venant des différentes macromolécules. La cristallographie des neutrons est devenu un outil puissant.

Ceci étant, bien qu'il soit connu que l'eau lourde apporte une augmentation d'énergie des liaisons hydrogène par un facteur de 0,24 kilocalorie par mole, rien ne permettait de prévoir l'influence de l'eau lourde sur la stabilisation de molécules solubilisées par l'eau, car interviennent des phénomènes autres que la nature de la liaison entre le solvant et la molécule, ces phénomènes tels que l'effet cage, étant à ce jour mal connus. Les effets coopératifs eau/ADN/protéines à l'intérieur des virus restent également à ce jour mal connus. Les confirmations peuvent éventuellement être données par les études cristallographiques (neutrons et rayons X).

L'un des buts de l'invention est de proposer des compositions pharmaceutiques stabilisées, physiologiquement compatibles.

L'un des buts de l'invention est de fournir un ensemble de compositions pharmaceutiques stabilisées, dans lesquelles les doses d'agents pharmaceutiques peuvent être réduites par rapport aux mêmes compositions thérapeutiques non stabilisées.

L'un des autres aspects de l'invention est de proposer un procédé de préparation simple d'un ensemble de compositions pharmaceutiques, notamment thérapeutiques, vaccinales ou de diagnostic, stabilisées.

Ces différents aspects sont obtenus par les compositions de l'invention.

A cet égard, la composition pharmaceutique stabilisée de l'invention, comprenant une ou plusieurs macromolécule(s) choisie(s) parmi les acides nucléiques, les lipides ou les glucides et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), est caractérisée en ce qu'elle comporte un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), l'un au moins de ces véhicules contenant de l'eau lourde (D_2O).

On a trouvé que la substitution de la totalité ou d'une partie des noyaux d'hydrogène par des noyaux de deutérium, dans les molécules d'eau qui servent de solvant à une molécule ou à un complexe macromoléculaire qui constitue la substance active d'une composition pharmaceutique, permettait de stabiliser ladite composition pharmaceutique.

Dans la nature, l'hydrogène est composé de 0,0156% de deutérium. Celui-ci peut-être purifié par la distillation ou l'électrolyse de l'eau, pour obtenir de l'eau lourde pure, qui peut-être alors électrolysée pour obtenir du deutérium pur.

L'invention concerne l'utilisation de D_2O , ou des mélanges de D_2O et de H_2O , comme agents de stabilisation des macromolécules choisies parmi les acides nucléiques, les lipides ou des glucides ou des complexes macromoléculaires en phase aqueuse (solutions, suspensions ou émulsions).

Dans le contexte de cette invention, ce sont les propriétés de l'oxyde de deutérium, ou eau lourde, qui sont particulièrement intéressantes. Les noyaux H ou D qui s'échangent librement entre les molécules d'eau et entre les nombreux sites des macromolécules biologiques dissoutes, suspendues ou émulsifiées. D et H sont librement échangeables entre les sites d'hydrogène labiles, par exemple tous les hydrogènes dans la masse d'eau, ou beaucoup d'hydrogènes dans les macromolécules biologiques. D'autres hydrogènes, parfois cachés dans le milieu hydrophobe, sont moins accessibles, mais à l'issue d'une période variable, peuvent eux aussi être échangés.

Dans H_2O , D_2O ou des mélanges des deux, les propriétés physiques des solutions montrent une graduation linéaire des propriétés physiques (telles que la densité ou le point d'ébullition ou les valeurs molaires pour l'énergie des liaisons hydrogènes).

Les macromolécules et complexes macromoléculaires visés dans l'invention sont tels qu'ils ont un poids moléculaire d'au moins 1500 Da, et avantageusement supérieur à 5000 Da.

Pour fixer les idées, la stabilisation des macromolécules est telle que pour une température donnée, par exemple aux environs de 40°C, on peut observer une augmentation de stabilité des macromolécules ou complexes

macromoléculaires, conservés dans une solution contenant D₂O, par rapport à ces mêmes macromolécules ou complexes macromoléculaires conservés dans une solution contenant H₂O.

Par exemple, pour les virus de la poliomyélite (voir résultats), cette stabilisation se traduit par une augmentation du nombre de particules virales actives d'un facteur d'environ 10³ à environ 10⁴.

Comme indiqué ci-dessus, les macromolécules visées dans l'invention sont des acides nucléiques, des glucides ou des lipides.

Quant aux complexes macromoléculaires, ils sont avantageusement choisis parmi les complexes protéines-glucides, protéines-lipides, acides nucléiques-glucides, acides nucléiques-lipides, acides nucléiques-protéines, éventuellement complexés avec des glucides et/ou des lipides, et parmi les virus.

A titre d'exemples de macromolécules biologiques et de complexes macromoléculaires, susceptibles d'entrer dans les compositions de l'invention figurent:

1) les acides nucléiques:

l'ADN, pour les applications *in vivo* (par exemple: thérapie génique) et *in vitro* (par exemple: applications diagnostiques);

l'ARN, des ribozymes pour les applications *in vivo* (modifications des acides nucléiques ou des complexes acides nucléiques/protéines);

l'ADN et l'ARN, font partie des génomes des virus utilisés comme vecteurs dans la thérapie ou la vaccinologie;

des complexes d'ADN/ARN naturels ou artificiels;

les acides nucléiques utilisés peuvent être ceux existant sous des formes naturelles ou artificielles (créées par le génie génétique);

2) les glucides:

ces macromolécules n'ont pas encore trouvé d'applications comme thérapeutiques indépendantes, mais dans leurs complexes avec les protéines, elles sont reconnues comme facteur majeur dans la modification des activités de ces protéines; les différentes formes glucidiques peuvent invoquer des activités physiologiques significatives (comme c'est le cas pour la tPA, où les différentes "glycoformes" ont des activités bien différentes);

3) les lipides:

les macromolécules lipidiques jouent des rôles importants dans les membranes cellulaires, mais hormis les molécules relativement petites comme les prostaglandines et les vitamines de groupe A, ces agents n'ont pas trouvé beaucoup d'applications thérapeutiques; leur intérêt se trouve dans leurs complexes macromoléculaires et en particulier dans leurs utilisations dans les

liposomes utilisés comme systèmes de livraisons pour d'autres agents thérapeutiques;

4) les complexes macromoléculaires:

les plus typiques sont les complexes des acides nucléiques et les protéines, ou les protéines et les glucides;

un virus est un complexe macromoléculaire composé éventuellement d'acides nucléiques, de protéines, de glucides et de lipides (par exemple, le virus de la grippe ou le virus HIV);

on peut également citer les complexes artificiels, telle qu'une couche lipidique enrobant un agent thérapeutique, ciblé par des activités localisées dans la couche lipidique, ayant une spécificité de liaison avec des composants de la cible visée.

Les compositions pharmaceutiques impliquées dans la présente invention peuvent être définies par:

A - soit une ou plusieurs macromolécule(s) et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), maintenus dans un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s),

B - soit une ou plusieurs macromolécule(s), et un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), maintenus séparément par rapport à un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), la (les) macromolécule(s), le (les) complexe(s) macromoléculaire(s) et le (les) véhicules pharmaceutiquement acceptable(s) étant destinés à être rassemblés en vue de l'administration à un patient,

C - soit au moins deux éléments, maintenus séparément les uns par rapport aux autres, et comportant chacun une ou plusieurs macromolécule(s) et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), l'un au moins de ces éléments étant en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable contenant de l'eau lourde, ces différents éléments étant destinés à être rassemblés en vue de l'administration à un patient,

D - soit au moins deux des compositions pharmaceutiques selon l'une des variantes A, B, ou C, maintenues séparément l'une par rapport à l'autre et destinées à être rassemblées en vue de l'administration à un patient.

A titre d'exemple, une composition correspondant au rassemblement en vue de l'administration à un patient des variantes selon B et C comprend les caractéristiques suivantes:

- d'une part une ou plusieurs macromolécule(s) et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s) sont maintenus séparément par rapport à un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), et d'autre part au moins

deux éléments sont maintenus séparément les uns par rapport aux autres, et comportent chacun une ou plusieurs macromolécule(s) et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), l'un au moins de ces éléments étant en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable contenant de l'eau lourde, la (les) macromolécule(s), le (les) complexe(s) macromoléculaire(s), le (les) véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s) et les susdits éléments étant destinés à être rassemblés en vue de l'administration à un patient.

Les macromolécules et/ou les complexes macromoléculaires peuvent être conservés ou non avec le véhicule pharmaceutiquement acceptable contenant de l'eau lourde.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les compositions sont telles que les macromolécules ou les complexes macromoléculaires sont soit en suspension, soit en solution, soit en émulsion dans le véhicule pharmaceutique.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les compositions sont telles que la ou les macromolécule(s) et/ou le ou les complexe(s) macromoléculaire(s) et le véhicule pharmaceutiquement acceptable sont maintenus séparément et sont destinés à être rassemblés en vue de l'administration à un patient.

A titre d'exemple, les macromolécules et/ou les complexes macromoléculaires peuvent être lyophilisés et mélangés avec le véhicule pharmaceutiquement acceptable peu de temps avant l'administration à un patient, ou au moment de cette administration.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans les compositions de l'invention le volume du véhicule pharmaceutique varie d'environ 0,1 ml à environ 20 ml, notamment d'environ 0,1 ml à environ 5 ml, et la quantité de macromolécule ou de complexe macromoléculaire varie d'environ 1 μ g à environ 3g.

Selon un mode de réalisation avantageux pour une dose unitaire, la quantité de macromolécule ou de complexe macromoléculaire est d'environ 10 μ g pour un volume d'environ 1 ml de véhicule pharmaceutique.

Selon encore un autre mode de réalisation, dans les compositions de l'invention, le véhicule pharmaceutique est un mélange H₂O-D₂O et le rapport en poids entre D₂O et H₂O varie d'environ 10% à environ 100%, avantageusement d'environ 40% à environ 95%, et de préférence d'environ 80% à environ 95%.

En général, les mélanges D₂O/H₂O, contenant des concentrations élevées en D₂O (90-100%), donnent une stabilisation équivalente à une réduction de

température ambiante d'un facteur de 4-5°C (c'est à dire dans 95% de D₂O à 25°C - par exemple - une macromolécule subit un effet de dégradation qui équivaut à celui observé normalement dans H₂O à 20°C).

De plus, les concentrations élevées en D₂O offrent une protection importante contre les suites de la contamination microbienne. Peu de microbes tolèrent les concentrations de D₂O dépassant les 70%. Ainsi l'eau lourde est effectivement un milieu auto-stérilisant (à noter, que certaines microbes, généralement non-pathogéniques, peuvent être adaptés à la vie en milieu D₂O).

Les compositions de l'invention sont non toxiques. En effet, il est connu que D₂O à une concentration inférieure à 10% de l'eau corporelle n'a pas d'effet toxique significatif. (Voir A. Barbour, H.G., (1937), Yale J. Biol. Med. 9, 551 - B: Barbour, H.G., (1938), Am. J. Cancer, 32, 440- C: Barbour, H.G. (1938), J. Pharm. Exp. Therap., 62, 158 - D: Barbour, H.G., (1936), J. Pharm. Exp. Rherap., 58, 460).

Les agents pharmaceutiques susceptibles de bénéficier de ces effets stabilisateurs sont souvent chers et contenus dans des petits volumes (vaccin oral, par exemple 0,15 ml); ainsi le prix relativement élevé de D₂O a moins d'importance.

Comme D₂O et H₂O sont entièrement miscibles, et comme les atomes d'hydrogène (¹H et ²H) labiles s'échangent rapidement, on peut constater qu'une dose de D₂O contenant un agent protecteur ou thérapeutique sera rapidement dispersée dans la masse d'eau corporelle. Avec une abondance naturelle de 0,0156% des atomes d'hydrogène, la masse de deutérium dans une personne de poids de 75kg sera d'environ 1g, équivalent à 10g d'eau lourde. L'administration des petits doses (par exemple: 0,1 à 5,0 ml) ne dépassera pas la quantité d'eau lourde déjà présente dans le corps d'un adulte. Même les doses très élevées (10 ml à 50 ml) ne contribuent pas à un niveau de deutérium (environ 0,1%) approchant les concentrations toxiques (soit 10% - 20%) ou mortelles (25% et plus).

L'eau lourde ne s'accumule pas dans l'organisme et elle est rejetée dans l'urine, la transpiration et la respiration, au même titre que l'eau.

En résumé, les expériences et les observations discutées démontrent qu'il y a un effet stabilisateur pour les macromolécules et leurs complexes, d'environ 5°C, associé à l'eau lourde. Malgré les changements de température relativement faibles et qui sont de l'ordre de 2°C à 5°C, les effets coopératifs mentionnés au-dessus peuvent contribuer à une augmentation importante de stabilité. Les macromolécules et même les organismes vivants (certains microbes, généralement non-pathogéniques, pouvant être adaptés à la vie en

milieu D₂O) ont montré une résistance aux températures normalement associées (en milieu H₂O) à la dénaturation thermique. Certains complexes ont montré une résistance réversible à la désagrégation induite par les solutions de faible force ionique (en H₂O, par exemple inférieure à KCl 1mM).

Dans les compositions de l'invention, le véhicule pharmaceutique peut contenir un adjuvant de stabilisation, avantageusement MgCl₂, de la carboxyméthyl cellulose, du polyéthylène glycol, des molécules glucidiques, tels que glycérol, glucose, sucrose, (et autres sucres C6), les sucres pentoses et leurs polymères (les amidons par exemple), ces molécules glucidiques pouvant être complexées avec le polyéthylène glycol, le polyéthylène glycol présentant avantageusement un poids moléculaire d'environ 500 à environ 5000 daltons, et notamment d'environ 1000 à environ 5000 daltons.

En application clinique, D₂O (et ses mélanges) peut également être utilisé avec les régulateurs de tonicité, de pH, de viscosité et d'autres agents stabilisateurs tels que ceux indiqués ci-dessus.

Dans les compositions de l'invention, le rapport en poids entre l'adjuvant de stabilisation et le véhicule pharmaceutique est tel que le véhicule pharmaceutique ne présente pas une viscosité supérieure à environ 0,2 Pascal-secondes (20 centipoises).

Dans les compositions de l'invention le rapport en poids entre l'adjuvant de stabilisation et le véhicule pharmaceutique est inférieur à environ 30%, et est avantageusement d'environ 1% à environ 30%, et de préférence encore d'environ 10% à environ 30%.

Dans les compositions de l'invention les complexes macromoléculaires et les macromolécules sont ceux utilisés:

- dans des compositions vaccinales, telles que celles contre la poliomyélite, contre la rougeole, contre l'hépatite, notamment l'hépatite B ou C, contre la grippe, contre le virus du syndrome immuno déficitaire acquis (virus du SIDA également désigné par HIV = human immunodeficiency virus), contre la diphtérie, contre le tétanos, contre la coqueluche ou contre une combinaison d'au moins deux des susdites pathologies, (par exemple le vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite [DTP], ou le vaccin contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite et la coqueluche, commercialisé sous la marque TETRACOQ,

- en tant qu'agent de diagnostic, notamment pour le diagnostic de la rougeole, de la méningite ou de HIV ou,

- en tant qu'agent thérapeutique, tels que des acides nucléiques ou des ribozymes.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une composition pharmaceutique de l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- soit la dilution à l'aide de D₂O en quantité appropriée, de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solution aqueuse, préalablement concentrée, par exemple à raison de 20 mg/ml,
- et/ou la dialyse, contre D₂O en quantité appropriée, de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solution aqueuse,
- soit la resuspension de la susdite composition pharmaceutique, se présentant sous forme de solide, à l'aide de D₂O, en quantité suffisante pour obtenir la concentration appropriée de la composition pharmaceutique.

On utilise avantageusement la dialyse dans le cas où la composition pharmaceutique contient une substance active fragile, résistant mal aux autres traitements physiques.

L'invention concerne également un procédé de fabrication d'une préparation stabilisée d'origine virale, contenant des complexes macromoléculaires, caractérisé en ce que lesdits complexes macromoléculaires sont mis en solution, suspension ou émulsion dans un milieu contenant de l'eau lourde.

Par préparation d'origine virale, on entend notamment

- les virus complets, inactivés ou atténués,
- les protéines glycoprotéines virales, qu'elles soient de surface ou internes et qu'elles soient obtenues à partir de virus ou par recombinaison génétique connue, par exemple la protéine de surface du virus de l'hépatite B,
- les vecteurs viraux, tels que les adénovirus, les poxvirus comme le canary pox, ou le virus de la vaccine exprimant les protéines d'origine virale ou bactérienne (voir par exemple le brevet européen: EP 083 286),
- les acides nucléiques (ARN ou ADN) encapsulés ou non, connus par exemple sous le nom de "naked DNA" par la demande de brevet européen EP 465 529 (WO 90/11092), ou le brevet américain USP 4 394 448, qui décrit l'encapsulation de l'ADN ou de fragments d'ADN dans des vésicules lipidiques.

L'invention concerne également un procédé de stabilisation d'une préparation vaccinnante d'origine virale, notamment d'une suspension virale, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'incorporation d'eau lourde:

- soit au virus ou aux cellules à infecter, avant la mise en contact entre les cellules à infecter et le virus,
- soit dans le milieu de culture des cellules infectées par le virus,

- soit dans la préparation vaccinnante obtenue à l'issue de l'étape précédente.

L'eau lourde peut être ajoutée à n'importe quelle étape impliquée dans le procédé de préparation de la suspension virale, de préférence après la récupération des particules virales, à l'issue de l'étape de culture des cellules infectées par le virus.

Dans le cas d'un vaccin préparé sous forme lyophilisée, l'eau lourde peut être utilisée pour la préparation de la suspension virale, avant la lyophilisation et/ou pour la réhydratation du susdit vaccin lyophilisé. On utilise de préférence l'eau lourde au stade de la réhydratation.

Les vaccins auxquels s'appliquent avantageusement l'invention sont les suivants: grippe, varicelle, rougeole, oreillons, rubéole, dengue, HIV, herpès.

Les exemples cités ci-dessous ont purement une valeur illustratrice, et ne doivent pas être interprétés comme limitant la portée de cette invention.

Ils démontrent:

1:- la thermostabilisation d'un vaccin important;

2:- la stabilisation d'un complexe macromoléculaire modèle, illustrant la réversibilité des effets de thermostabilisation dus à D₂O et ses effets isotopes associés.

Ces exemples peuvent être appliqués aux cas suivants:

à un ribozyme;

au vaccin recombinant contre l'hépatite B et C,

au vaccin contre la grippe,

au vaccin contre la rougeole,

au vaccin DTP (diphtérie, tétanos, poliomyélite),

au vaccin contre le tétanos,

au kit pour le diagnostic d'HIV.

Il convient de noter que dans ce qui précède et ce qui suit, l'ensemble des documents de la littérature cités est incorporé par référence.

Descriptions des figures:

La figure 1 représente la thermostabilité, à 37°C, d'une composition pharmaceutique selon l'invention.

L'axe des abscisses correspond au temps (exprimé en jours) et l'axe des ordonnées correspond au logarithme de la concentration des particules virales (exprimé en unité DICC₅₀/ml, DICC₅₀ étant la dose infectieuse cytotoxique dans la cellule).

La courbe représentée par des losanges correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse; la courbe représentée par des carrés correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse, contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant; la courbe représentée par des triangles correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans de l'eau lourde à 95%; la courbe représentée par des croix correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans D_2O et contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant.

La figure 2 représente la thermostabilité à 42°C d'une composition pharmaceutique selon l'invention.

L'axe des abscisses correspond au temps (exprimé en jours) et l'axe des ordonnées correspond au logarithme de la concentration des particules virales (exprimé en unité $\text{DICC}_{50}/\text{ml}$).

La courbe représentée par des losanges correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse; la courbe représentée par des carrés correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse, contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant; la courbe représentée par des triangles correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans de l'eau lourde à 95%; la courbe représentée par des croix correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans D_2O et contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant.

La figure 3 représente la thermostabilité à 45°C d'une composition pharmaceutique selon l'invention.

L'axe des abscisses correspond au temps (exprimé en jours) et l'axe des ordonnées correspond au logarithme de la concentration des particules virales (exprimé en unité $\text{DICC}_{50}/\text{ml}$).

La courbe représentée par des losanges correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse; la courbe représentée par des carrés correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse, contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant; la courbe représentée par des triangles correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans de l'eau lourde à 95%; la courbe représentée par des croix correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans D_2O et contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant.

La figure 4 représente l'inactivation thermique du poliovirus Sabin de type 3. La concentration initiale du virus est fixée à 5×10^6 DICC₅₀/50 μ l. (DICC₅₀ = dose infectieuse cytotoxique dans la cellule).

Des suspensions du virus de Sabin de type 3 de titres égaux (5×10^6 DICC₅₀/50 μ l) sont préparés dans les milieux suivants:

a) Dulbecco-MEM dans l'eau normale (correspondant à l'abréviation "milieu H" sur la figure);

b) Dulbecco-MEM dans D₂O de concentration finale 87% (correspondant à l'abréviation "milieu D" sur la figure);

c) MgCl₂ 1M dans H₂O, Tris tamponné à pH 7.2 (correspondant à l'abréviation "milieu H-Mg" sur la figure); et

d) MgCl₂ 1M dans D₂O de concentration finale 87%, Tris tamponné à pH 7.2 (correspondant à l'abréviation "milieu D-Mg" sur la figure).

Après 3 jours d'incubation (partie A de la figure 4) et après 7 jours d'incubation (partie B de la figure 4) à 4°C, 37°C, 42°C et 45°C, le type du virus est déterminé. Les résultats sont exprimés comme différence de log de DICC₅₀/50 μ l entre le titre initial du virus maintenu à -30°C et le titre de chaque échantillon. La moyenne et l'erreur standard sont indiqués pour chaque résultat.

La figure 5 représente l'inactivation thermique du poliovirus Sabin de type 1 en présence de D₂O et/ou MgCl₂ (voir détails figure 4). La partie A de la figure 5 correspond à 3 jours d'incubation, et la partie B de la figure 5 correspond à 7 jours d'incubation.

La figure 6 représente l'inactivation thermique du poliovirus Sabin de type 2 en présence de D₂O et/ou MgCl₂ (voir détails Figure 4). La partie A de la figure 6 correspond à 3 jours d'incubation, et la partie B de la figure 6 correspond à 7 jours d'incubation.

La figure 7 représente la stabilisation du poliovirus Sabin de type 3, avec diverses concentrations d'eau lourde et de MgCl₂.

On réunit les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans la figure 4, sauf pour la concentration de D₂O (partie A de la figure 7) ou MgCl₂ (partie B de la figure 7).

Les résultats sont exprimés comme différence entre le titre initial de la suspension virale conservée à -30°C (log de DICC₅₀/50μl) et le titre de chacun des échantillons après 3 jours d'incubation à 45°C. Le titre initial du virus est de 5x10⁶ DICC₅₀/50μl.

La figure 8 représente la présence ou l'absence de sédimentation de PNN (noyau de nucléosome), selon la force ionique de l'eau, et selon la présence ou non d'eau lourde.

La sédimentation des PNN a été faite à pH 7,75 (en milieu de D₂O, pH 8,15 selon l'électrode de verre) 0,2mM EDTA, à une force ionique selon le Tableau 1 ci-après. Toutes les sédimentations sont faites dans le MSE CENTRISCAN, ultracentrifugeuse analytique, dans le rotor comportant 6 cellules de mesure à 50.000 t/mn. Les parties A à C correspondent à un intervalle de mesure de 6 minutes, les parties D à G correspondent à un intervalle de mesure de 8 minutes, longueur d'onde: 254nm; concentration des échantillons: 0,5 à 1,0 mg/ml.

L'axe des abscisses correspond au rayon de la mesure et l'axe des ordonnées à la concentration en ADN. Cette figure démontre que l'eau lourde consolide les particules de PNN autant que la force ionique.

EXEMPLE 1-

Thermostabilisation du poliovirus avec l'eau lourde

L'immunogénicité des virus atténués dans le vaccin de Sabin contre la polio, dépend de leur degré infectieux au moment de l'administration. Les niveaux de prises du vaccin oral contre la polio (OPV) sont liés à la dose de chacune des trois souches virales 1, 2 et 3, constituant le vaccin. Une explication pour les niveaux de prises assez bas dans certains pays du tiers monde, peut être les ruptures dans la chaîne du froid avant l'administration du vaccin. La souche 3 du vaccin de Sabin est très critique, à cause de son immunogénicité et de sa thermostabilité qui sont relativement médiocres.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) demande à ce jour que l'OPV soit stabilisé par l'addition de MgCl₂ (concentration 1 M) dans le vaccin. Loin d'être la solution idéale, (perte de moins de 0,5 log d'activité après sept jours à 45°C), cette méthode est actuellement le meilleur compromis.

Il est démontré ici que selon l'invention, l'eau lourde à 95% offre, même sans aucun autre adjuvant, une stabilisation équivalente ou supérieure à celle offerte par MgCl_2 , en suivant les procédés entièrement standard (à part, bien sûr, le fait d'utiliser l'eau lourde).

Objectifs expérimentaux

Toutes les références à l'eau lourde (D_2O), dans les exemples ci-après, font référence à l'eau lourde à 95%.

1 Détermination et quantification des effets de D_2O sur la stabilisation du vaccin de Sabin.

2 Comparaison des effets de thermostabilisation de: (a) D_2O et (b) D_2O additionné de MgCl_2 .

La souche type 3 est responsable de la plupart des problèmes associés au vaccin de Sabin. Pour cette raison, ce virus a été la cible des études préliminaires.

Contexte globale de l'étude sur le vaccin de polio.

Dans l'homme, l'immunogénicité de l'OPV est associée au caractère infectieux de la suspension virale. La possibilité que présente l'OPV de se dégrader dans les régions ayant des températures ambiantes élevées est un problème (voir ci-dessus). Pour l'OMS, le but d'éliminer la polio avant l'année 2000 dépend en partie de l'amélioration des procédés de stabilisation des vaccins actuels (surtout pour les pays en voie de développement).

Les résultats suivants montrent que la souche 3 du vaccin de Sabin, bénéficie d'une stabilisation très marquée dans l'eau lourde à 95% (les autres conditions étant semblables à celles utilisées avec l'eau), sans autre agent de stabilisation. L'effet de D_2O est légèrement supérieure à la meilleure des solutions actuelles (MgCl_2 , 1M)

Méthodes expérimentales

La souche Sabin 3 est choisie comme modèle. La culture des virus est faite selon les procédés classiques.

L'addition d'eau lourde est effectuée en resuspendant le culot de virus (sédimenté dans une ultracentrifugeuse selon les conditions standard) dans D_2O (19 volumes) et un tampon PBS (tampon salin phosphaté) 20 fois concentré (1 volume). L'ultracentrifugation est sans gêne significative pour les virus. Les

études comparatives sont faites avec les milieux standard (H_2O , $H_2O/MgCl_2$ et $MgCl_2 + D_2O$).

La concentration du virus est ajustée à approximativement 10^{10} unités/ml dans D_2O à 95%.

Les virus sont soumis à différentes conditions thermiques selon les courbes montrées ci-après.

Virus - titration

Pour tous les échantillons, des dilutions en série sont effectuées (MEM Eagles avec sels d'Earle, 4%SVF, 3% bicarbonate de sodium, pénicilline, streptomycine). Une suspension de cellules Hep2C est ajoutée et l'ensemble est incubé à $35^{\circ}C$ pendant 5 à 7 jours. Les plaques sont colorées avec du "noir de naphthalène" pour évaluer la viabilité des cellules. Les titres sont ensuite calculés. Chaque expérience comporte des contrôles.

Les résultats ci-après concernent la mesure de la stabilité des compositions de l'invention aux trois températures suivantes:

$37^{\circ}C$,

$42^{\circ}C$,

$45^{\circ}C$.

RESULTATS, Jours à $37^{\circ}C$ Log des unités virales, moyenne de trois échantillons

Jours	H_2O	$MgCl_2$	D_2O	$MgCl_2/D_2O$
0	10	10	10	10
2	8.6	9.5	9.6	9.6
5	7.8	8.1	8.1	8.2
7	6.8	7.5	7.7	7.8

RESULTATS, Jours à $42^{\circ}C$ Log des unités virales, moyenne de trois échantillons

Jours	H_2O	$MgCl_2$	D_2O	$MgCl_2/D_2O$
0	10	10	10	10
2	5.4	8.8	9.4	9.3
5	3.4	5.4	6.0	6.2
7	2.8	5.2	5.5	5.4

RESULTATS, Jours à 45°C Log des unités virales, moyenne de trois échantillons

Jours	H ₂ O	MgCl ₂	D ₂ O	MgCl ₂ /D ₂ O
0	10	10	10	10
2	4.6	7.8	8.5	8.7
5	1.8	4.8	5.8	6.5
7	0.4	4.7	4.7	4.9

EXEMPLE 2

Stabilisation de l'architecture de la nucléosome par D₂O

Le noyau de la nucléosome (PNN) est composé de quatre paires de molécules protéiques, les histones H2a H2b, H3 et H4. Chaque octamère de protéine est entouré de 144 paires de base d'ADN, complétant 1,75 tours superhélicale (Noll M. (1974) Nature 251, 249-251; Kornberg R.D. (1974) Science 184, 868-871; Finch J. et al. (1977) Nature 269, 29-35). Gordon a étudié l'effet de la force ionique (en milieu H₂O) sur les propriétés de sédimentation de la PNN (Gordon V.C. et al. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci (USA). 75, 660-663). L'exemple ci-après illustre les différences importantes entre les propriétés de stabilisation de l'eau ordinaire et de l'eau lourde envers la PNN. La PNN peut être considérée comme une sorte de système modèle de la famille des complexes acide nucléique/protéine.

Méthodes expérimentales

La sédimentation des PNN préparées à partir d'érythrocytes de poulet (Suau P. et al (1977) Nuc. Acids. Res. 4, 3769-3786) est étudiée avec l'ultracentrifugeuse analytique (MSE CENTRISCAN) dans plusieurs conditions de force ionique et de concentrations en eau lourde. Plusieurs échantillons en H₂O sont après ré-équilibrés dans l'eau lourde en dialysant contre un volume important d'eau lourde, à diverses concentrations et compositions ioniques. Toutes les solutions sont tamponnées avec 0,2mM EDTA, pH 7,75 (en D₂O ajusté à pH 8,15 selon l'électrode de verre). La force ionique a été apportée par KCl.

Résultats

La sédimentation des PNN est dépendante de la composition ionique de l'eau. Très évidente est la désagrégation des PNN en milieu H₂O à faible

puissance ionique (Fig 4A). Dans l'eau lourde, cette dégradation des PNN ne se manifeste pas (Fig 4D). Même la dépendance ionique de la valeur de sédimentation (en unités Svedburg - s) devient très limitée (Voir Tableau 2 et Fig 4). La PNN désagrégée (4A), après dialyse contre l'eau lourde, redevient une particule discrète avec une sédimentation caractéristique pour une PNN.

Dans toutes les études, les PNN ont adopté - en milieu D₂O - la forme la plus compacte observée dans les milieux H₂O (après normalisation des valeurs de sédimentation pour corriger les différences de densité et de viscosité de l'eau lourde et de ses mélanges).

Dans les données complémentaires, non présentées ici, il est observé que la stabilisation à faible force ionique est manifeste à partir d'environ 40% de D₂O.

TABLEAU 1

Echantillon	[KCl] mM	Solvant	Valeur s	rayon de la première mesure (voir indice) mm
A	0	H ₂ O	-	63.15
B	5	"	10.2	63.15
C	25	"	11.2	65.43
D	0	D ₂ O	11.0*	63.29
E	25	"	11.2*	63.44
F- A redialysé	0	"	11.0*	63.00
G- C redialysé	0	"	11.1*	63.22

* valeurs corrigées selon viscosité et densité de D₂O.

Exemple 3: Stabilisation du vaccin poliovirus

Cette stabilisation est effectuée dans les conditions décrites dans les figures 4 à 7.

Les résultats représentés sur les figures 4 à 7 démontrent l'effet stabilisant de l'eau lourde. Quand les poliovirus (Sabin type 1, 2 et 3) sont préparés selon les procédures industrielles (dilution d'une suspension virale primaire: fluide surnageant clarifié de cultures de cellules infectées) en remplaçant les solutions

d'eau par des solutions contenant D₂O, dont la concentration finale est d'environ 90%, les résultats obtenus sont plus marquants que ceux obtenus avec les virus remis en suspension après la centrifugation (voir figs. 1-3).

Exemple 4: Stabilisation du vaccin poliovirus dans différentes solutions contenant de l'eau lourde.

L'addition de D₂O se fait au moment de la préparation du mélange de trois vaccins monovalents (Sabin de type 1, type 2, type 3) préparés en solution aqueuse. La concentration finale en D₂O est de 80%.

L'essai porte sur les formules suivantes:

1. Mélange albumine-MgCl₂ en solution aqueuse
2. Mélange albumine-MgCl₂ en solution contenant D₂O
3. Mélange acides aminés-MgCl₂ en solution contenant D₂O
4. Mélange acides aminés-saccharose en solution contenant D₂O

Titre global (DICC50/dose)							
Essais	70°C	7j à 37°C	perte (en log)	5j à 45°C	perte (en log)	7j à 45°C	perte (en log)
1 témoin alb.	6,63	5,48	1,15	3,47	3,16	3,20	3,43
2 alb. D ₂ O	6,57	5,90	0,67	4,67	1,90	4,13	2,44
3 A.A. DO	6,70	5,95	0,75	4,53	2,17	4,10	2,60
4 Sacch. D ₂ O	6,41	5,34	1,07	4,04	2,37	3,44	2,97

Exemple 5: Stabilisation du vaccin varicelle

Le virus Varicelle est un virus fragile.

La solution stabilisante habituelle du vaccin Varicelle a été préparée en solution aqueuse et en solution contenant de l'eau lourde (D₂O), à une concentration de 80%.

Une récolte de virus a été diluée dans les mêmes proportions avec chacun des stabilisants et lyophilisée. Les produits lyophilisés ont été réhydratés dans leur solvant respectif.

	Titres (PFU/dose) après réhydratation 2h à 37°C
H ₂ O	Perte = 0,69 log
D ₂ O	Perte = 0,37 log

PFU = unité conduisant à la formation de plaque.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique stabilisée comprenant une ou plusieurs macromolécule(s) choisie(s) parmi les acides nucléiques, les lipides ou les glucides, et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), l'un au moins de ces véhicules contenant de l'eau lourde (D_2O).

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle les complexes macromoléculaires sont choisis parmi les complexes protéines-glucides, protéines-lipides, acides nucléiques-glucides, acides nucléiques-lipides, acides nucléiques-protéines, éventuellement complexés avec des glucides et/ou des lipides, et parmi les virus.

3. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les macromolécules ou les complexes macromoléculaires sont soit en suspension, soit en solution, soit en émulsion dans le véhicule pharmaceutiquement acceptable.

4. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la ou les macromolécule(s) et/ou le ou les complexe(s) macromoléculaire(s) et le véhicule pharmaceutiquement acceptable sont maintenus séparément et sont destinés à être rassemblés en vue de l'administration.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le volume du véhicule pharmaceutique varie d'environ 0,1 ml à environ 20 ml, notamment d'environ 0,1 ml à environ 5 ml, et la quantité de macromolécule ou de complexe macromoléculaire varie d'environ $1\mu g$ à environ 3g.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le véhicule pharmaceutique est un mélange H_2O - D_2O et en ce que le rapport en poids entre D_2O et H_2O varie d'environ 10% à environ 100%, avantageusement d'environ 40% à environ 95%, et de préférence d'environ 80% à environ 95%.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le véhicule pharmaceutique contient un adjuvant de stabilisation, avantageusement $MgCl_2$, de la carboxyméthyl cellulose, du polyéthylène glycol, des molécules glucidiques, tels que glycérol, glucose, sucrose (et autres sucres en C6), pentoses et leurs polymères, ces molécules glucidiques pouvant être complexées avec le polyéthylène glycol, le polyéthylène glycol présentant avantageusement un poids moléculaire d'environ 500 à environ 5000 daltons, et notamment d'environ 1000 à environ 5000 daltons.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que le rapport en poids entre l'adjuvant de stabilisation et le véhicule pharmaceutique est tel que le véhicule pharmaceutique ne présente pas une viscosité supérieure à environ 0,2 Pascal-secondes (20 centipoises).

9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que le rapport en poids entre l'adjuvant de stabilisation et le véhicule pharmaceutique est inférieur à environ 30%, et est avantageusement d'environ 10% à environ 30%.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les complexes macromoléculaires et les macromolécules sont ceux utilisés :

- dans des compositions vaccinales, telles que celles contre la grippe, contre la poliomyélite, contre la rougeole, contre la varicelle, contre les oreillons, contre la rubéole, contre la dengue, contre l'hépatite, notamment l'hépatite B ou C, contre le virus du syndrome immuno déficitaire acquis (virus du SIDA), contre la diphtérie, contre le tétanos, contre la coqueluche ou contre une combinaison d'au moins deux des susdites pathologies, ou
- en tant qu'agent de diagnostic, tel que pour le diagnostic de la rougeole, de la méningite ou de HIV ou,
- en tant qu'agent thérapeutique, tels que des protéines, le facteur VIII, des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, des hormones, des acides nucléiques ou des ribozymes.

11. Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- soit la dilution à l'aide de D₂O de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solution aqueuse préalablement concentrée, par exemple à raison de 20 mg/ml,

- et/ou la dialyse contre D₂O de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solution aqueuse,

- soit la resuspension de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solide, à l'aide de D₂O en quantité suffisante pour obtenir la concentration appropriée de la composition pharmaceutique.

12. Procédé de préparation d'une composition stabilisée contenant des complexes macromoléculaires d'origine virale, caractérisé en ce que lesdits complexes macromoléculaires sont mis en solution, suspension ou émulsion dans un milieu contenant de l'eau lourde.

13. Procédé de stabilisation d'une préparation d'origine virale, éventuellement vaccinnante, notamment d'une suspension virale, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'incorporation d'eau lourde:

- soit au virus ou aux cellules à infecter avant la mise en contact entre les cellules à infecter et le virus,

- soit dans le milieu de culture des cellules infectées par le virus,

- soit dans la préparation vaccinnante obtenue à l'issue de l'étape précédente.

1/8

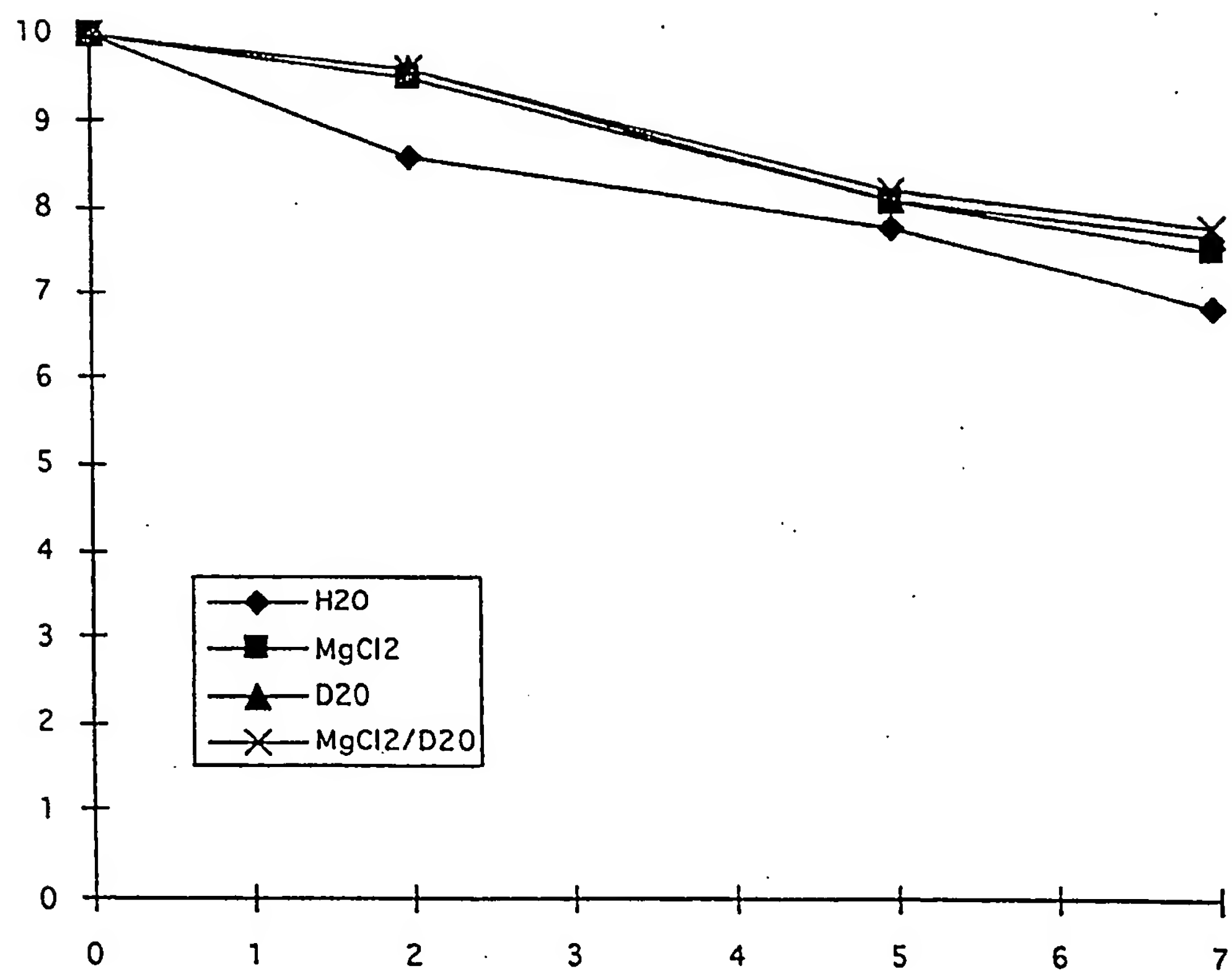


FIGURE 1

2/8

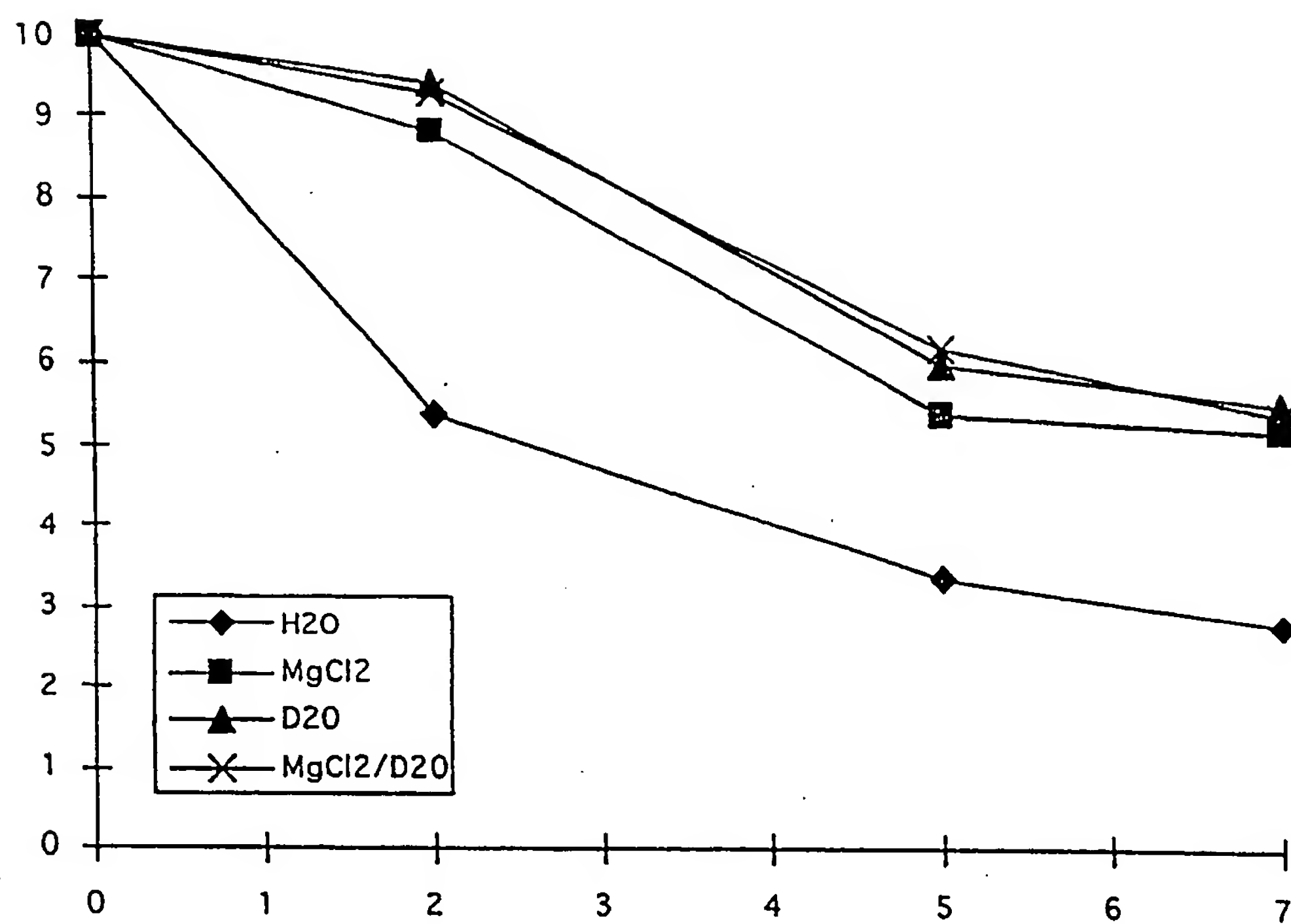


FIGURE 2

3/8

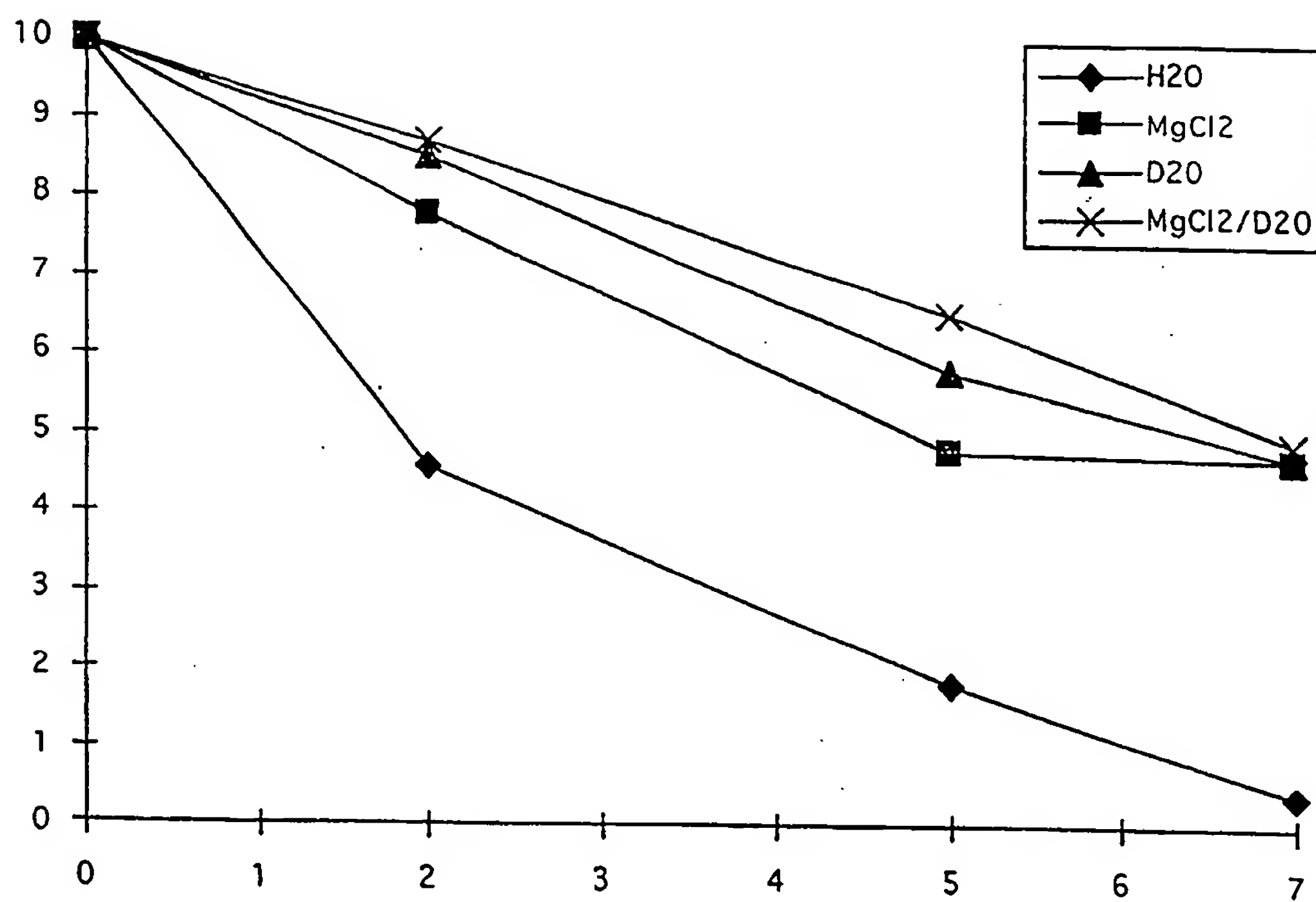
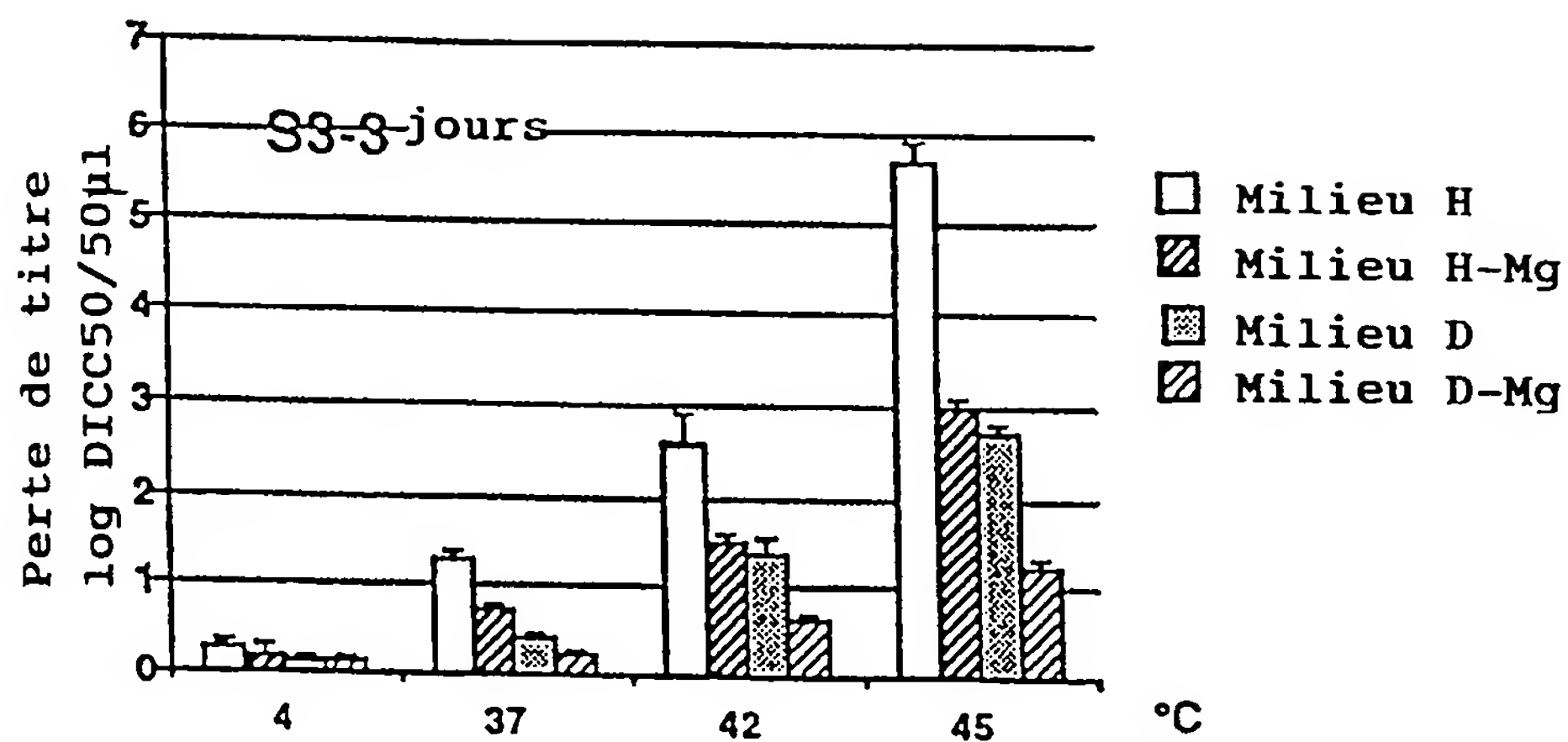


FIGURE 3

4/8

4A



4B

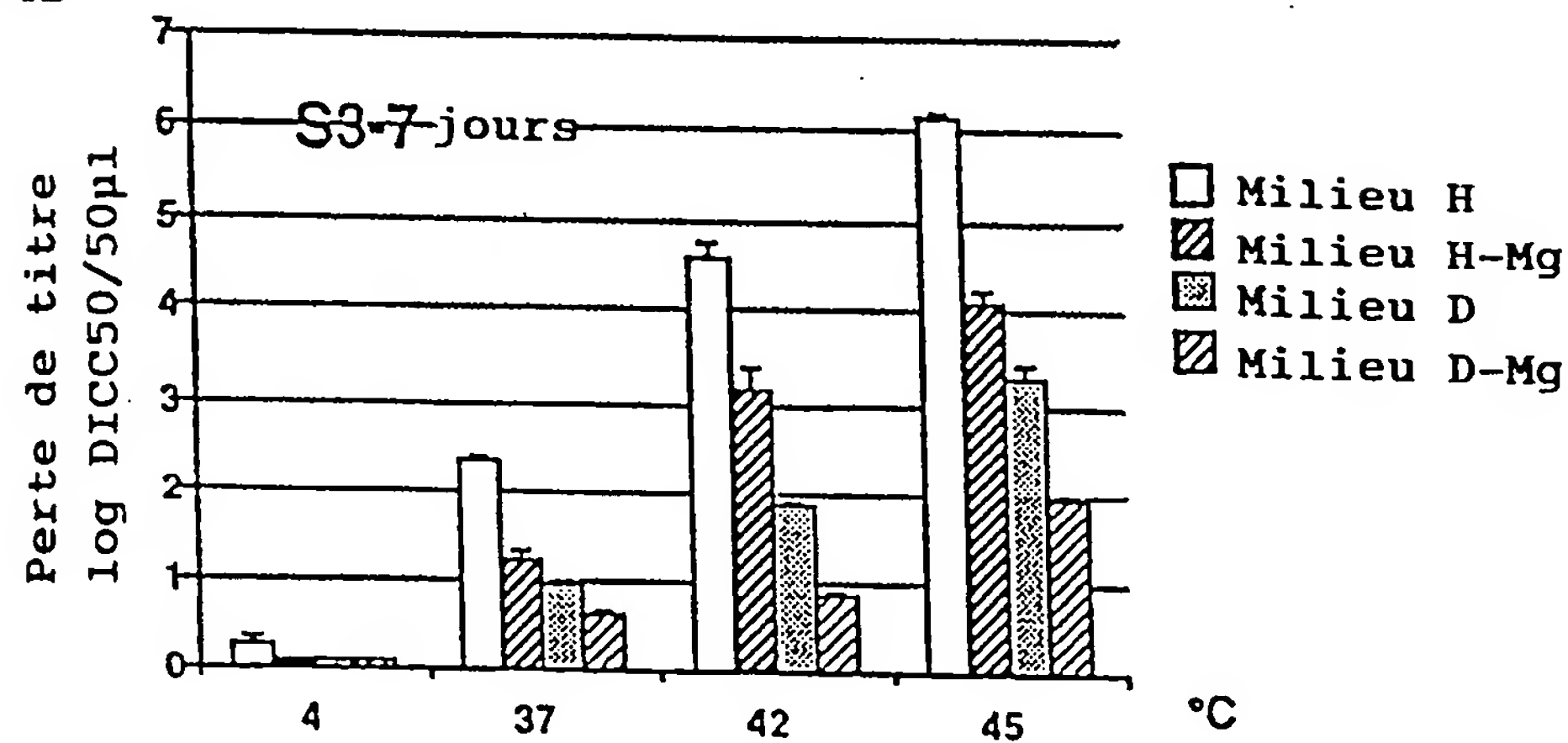
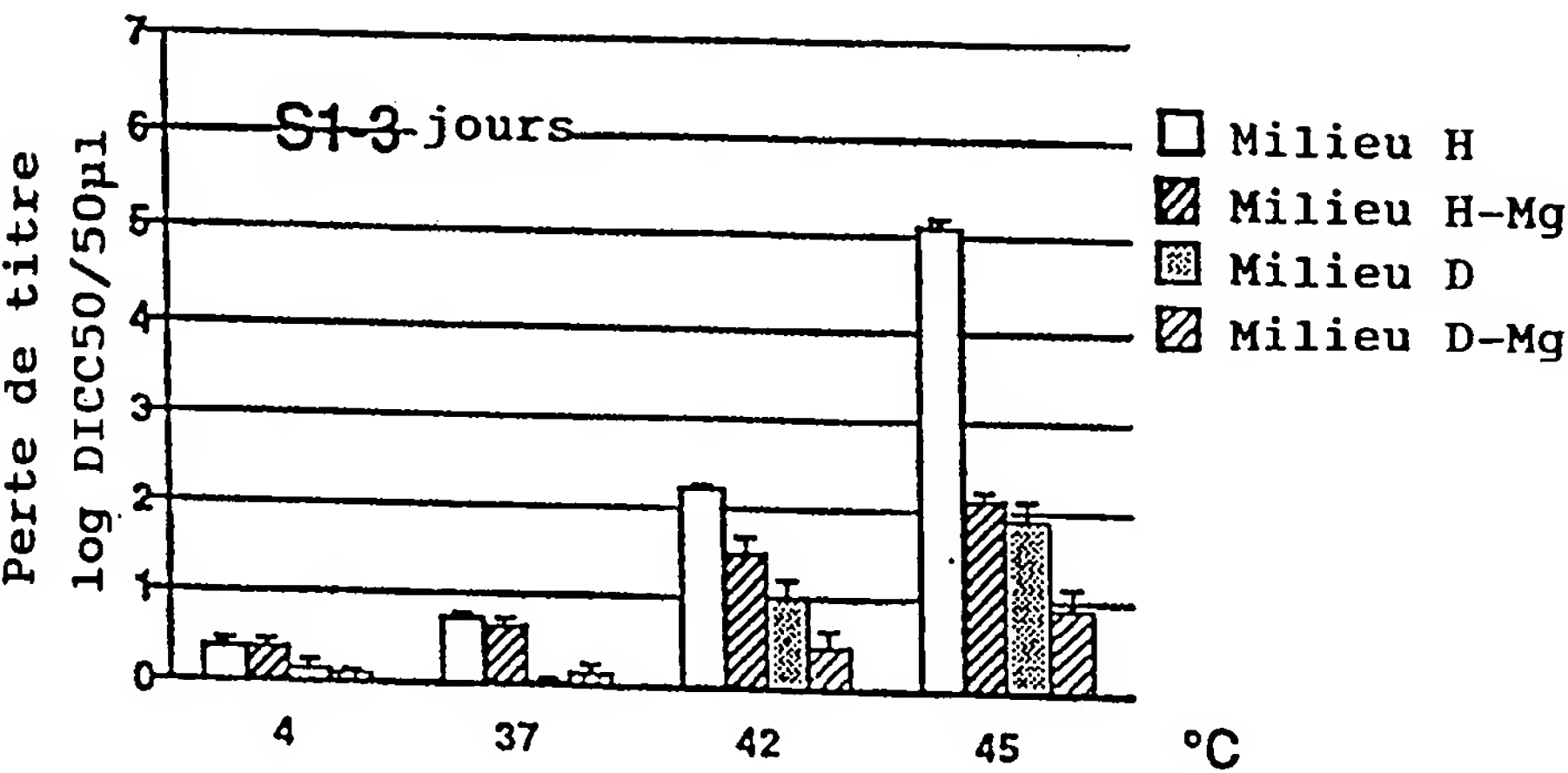


FIGURE 4

5/8

5A



5B

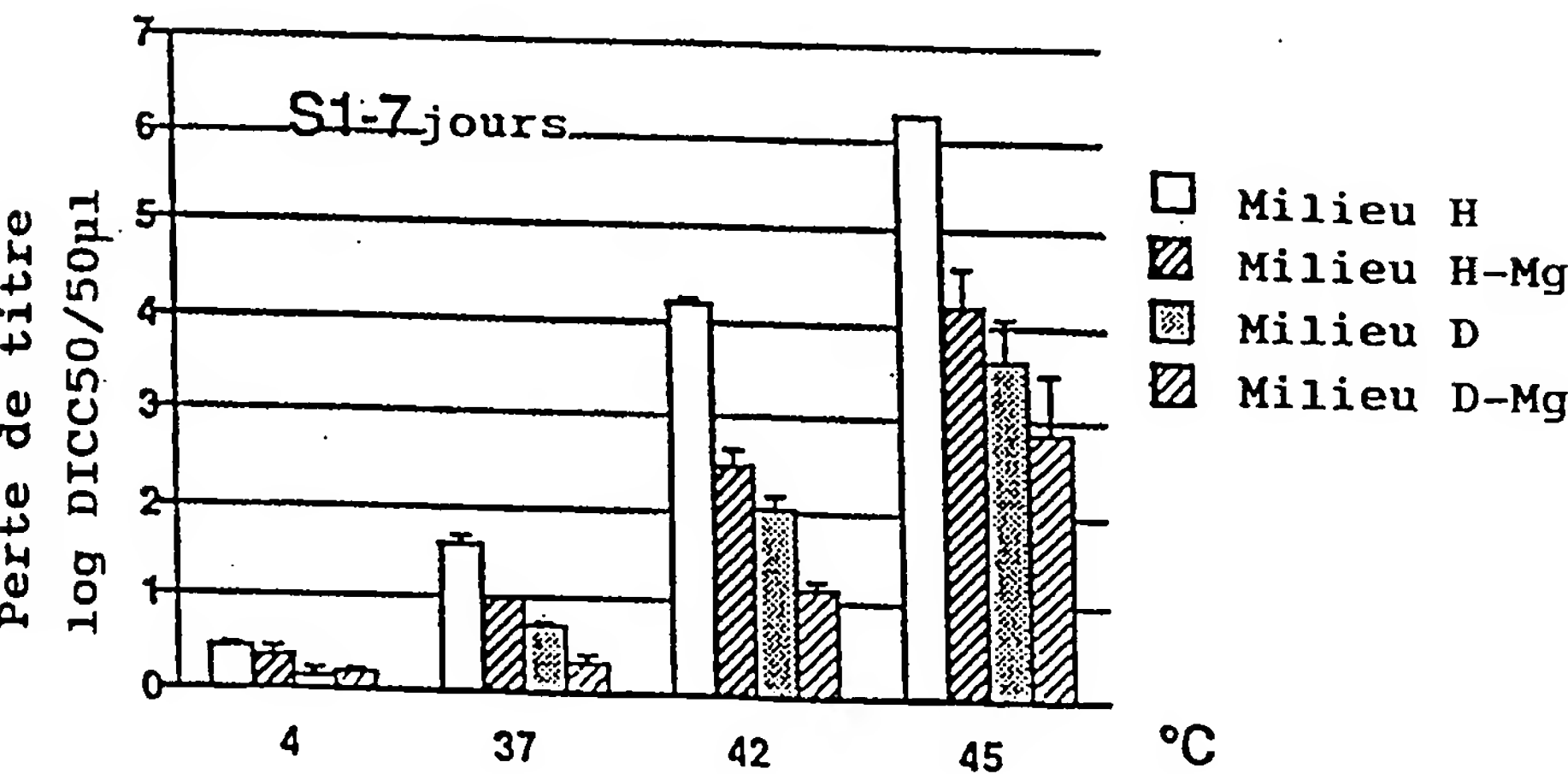
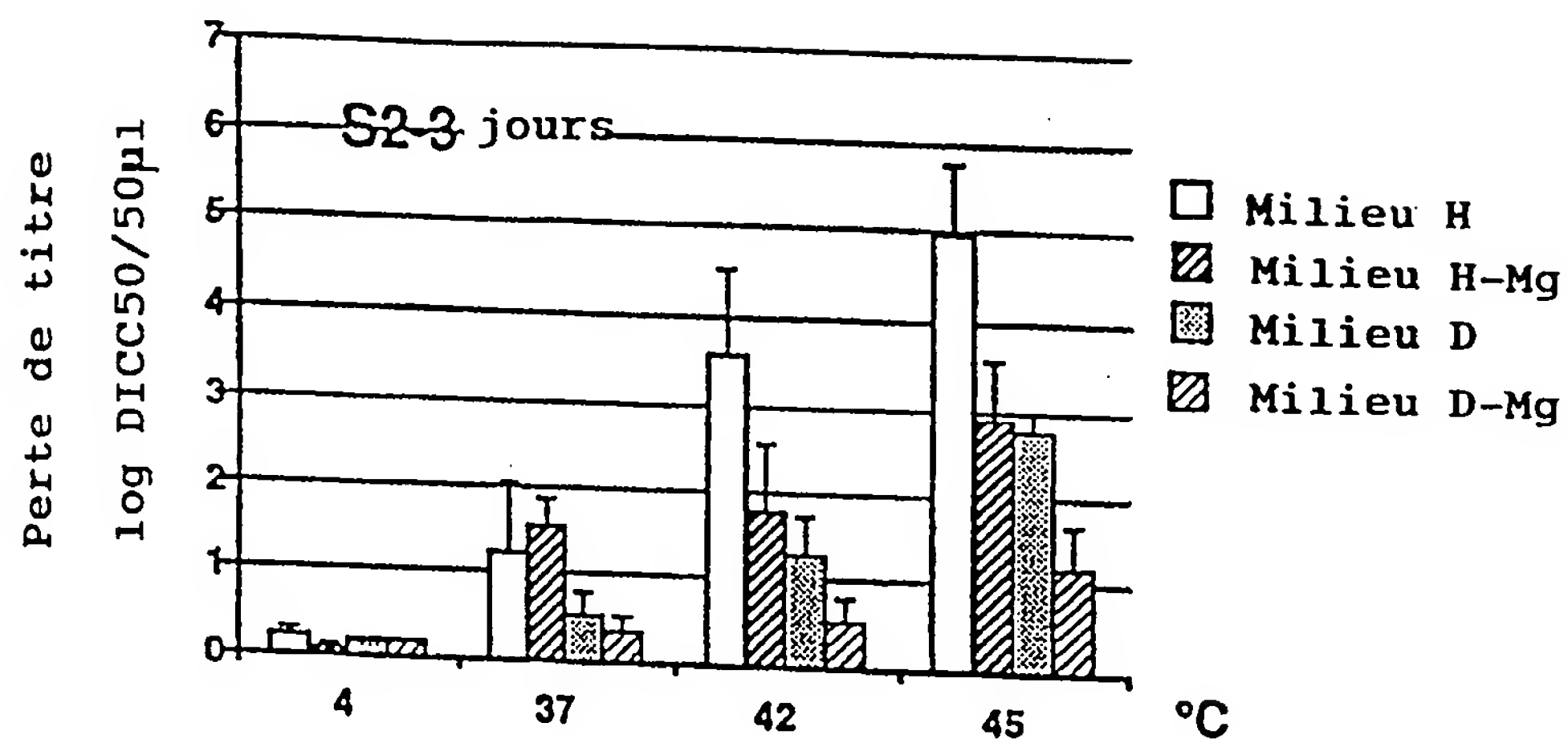


FIGURE 5

6/8

6A



6B

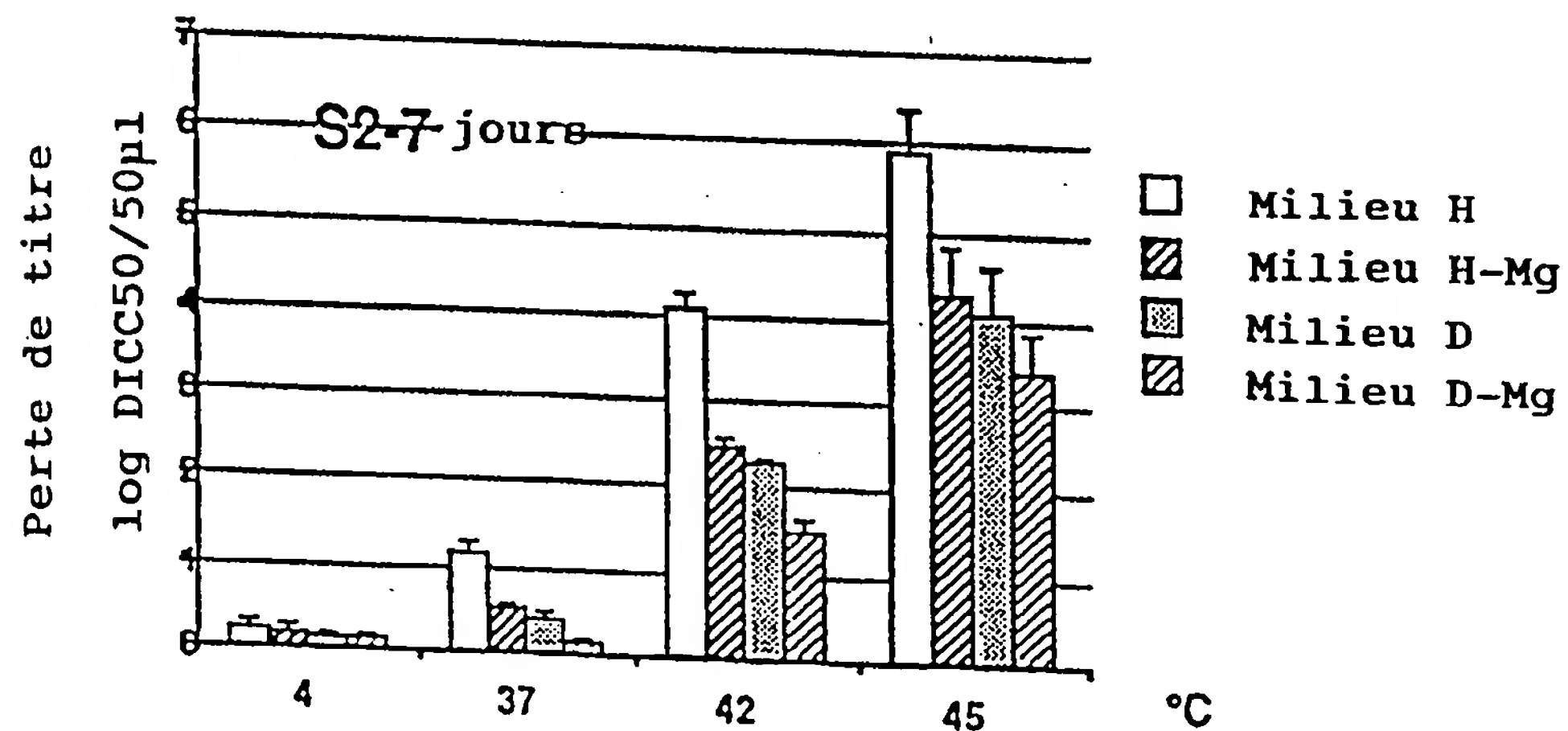


FIGURE 6

7/8

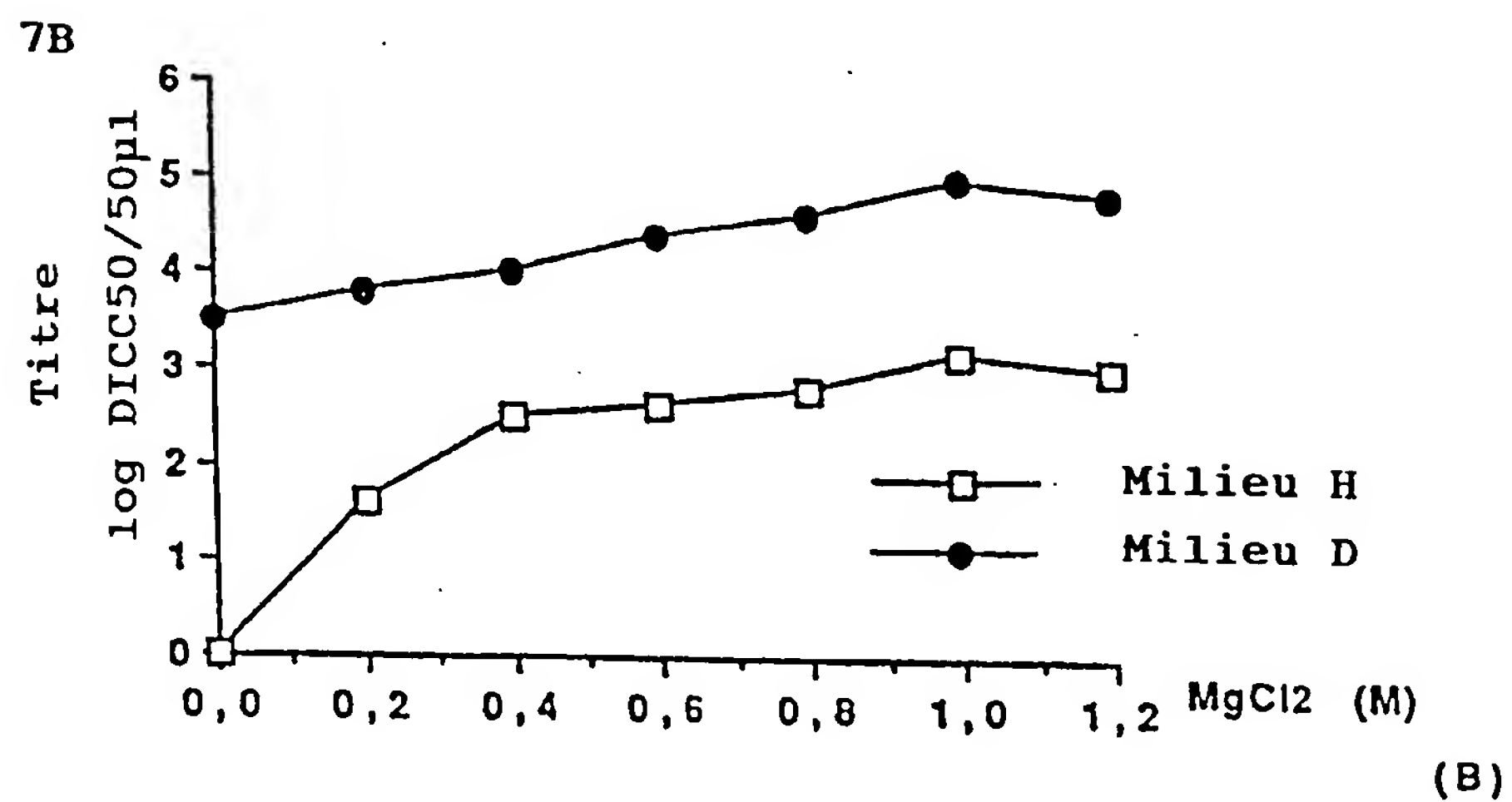
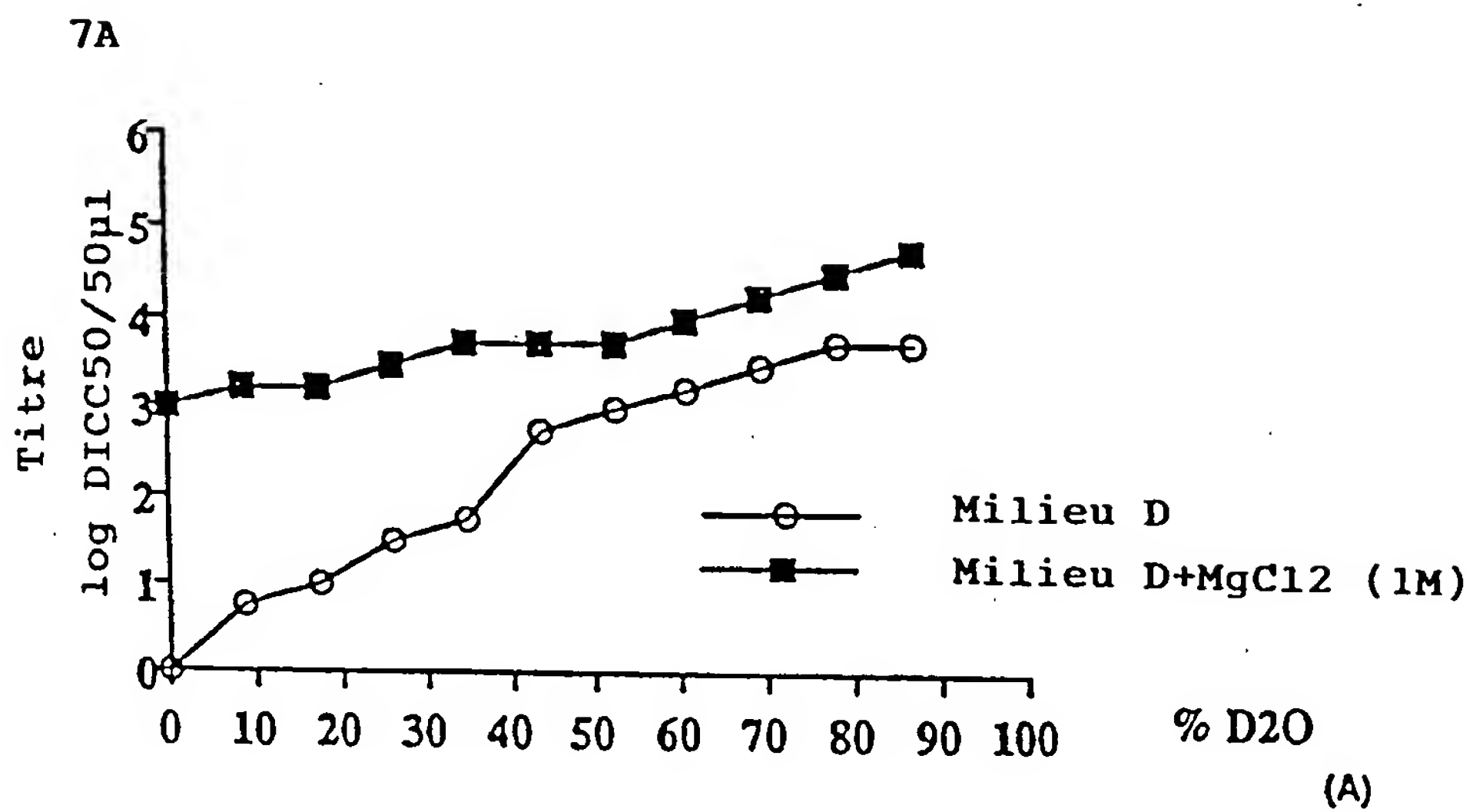


FIGURE 7

8/8

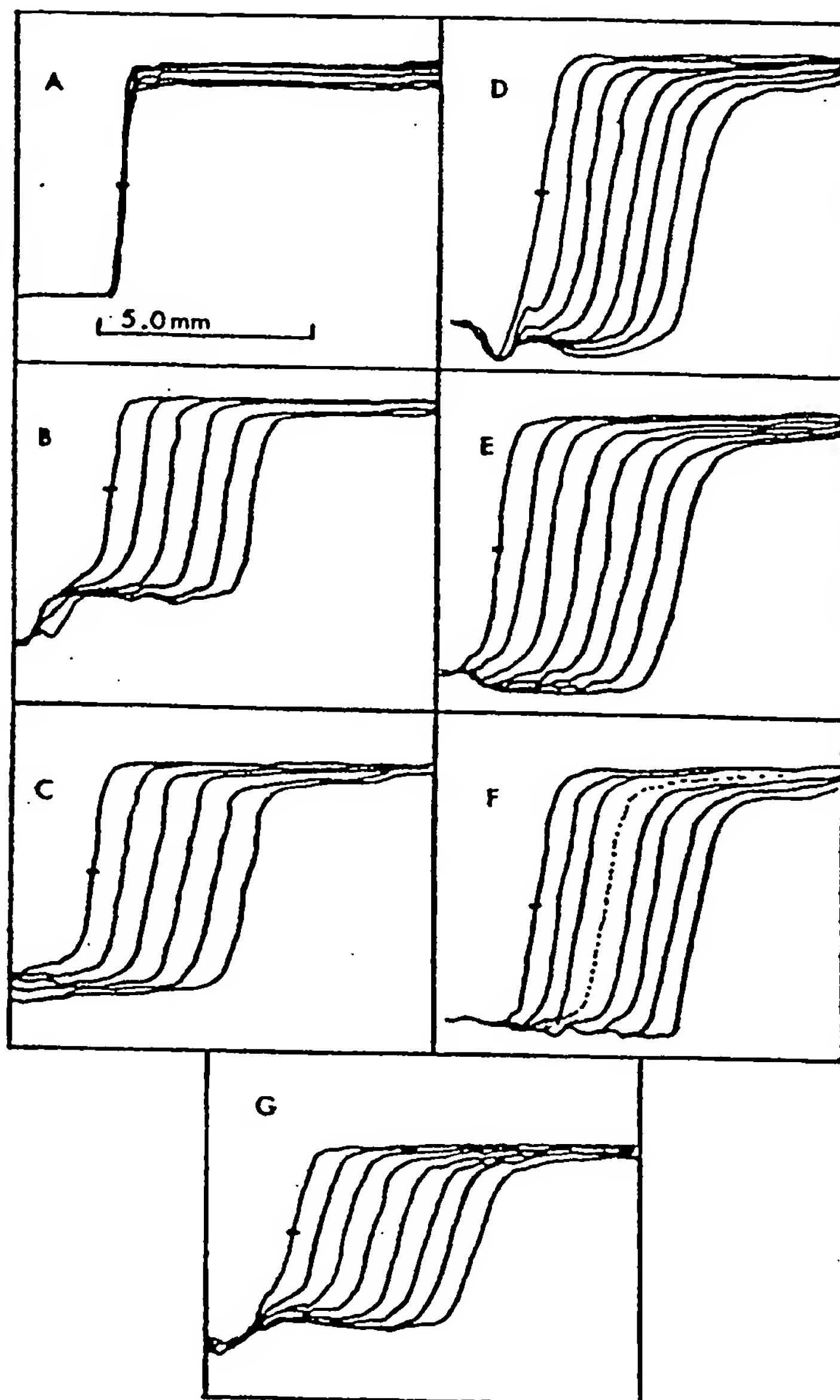


FIGURE 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00296

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61K47/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 332 826 (TEVA) 20 September 1989 see the whole document	1-12
Y	<p>---</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 4, 27 January 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 28099b, see abstract & Z.NATURFORSCH. vol. 46, no. 9-10 , 1991 pages 789 - 793 C.HEYDE ET AL. 'HEAVY WATER (D2O) PROTECTIVE EFFECT ON PROTEINS IN PHARMACEUTICALS.FOR EXAMPLE:HUMAN CHOLINESTERASE'</p> <p>--- -/-</p>	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 May 1994

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 94/00296

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 17, 27 October 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 148271w, see abstract & TSITOLOGIYA vol. 28, no. 8 , 1986 pages 790 - 795 V.YA.ALEKSANDROV 'STABILIZING EFFECT OF HEAVY WATER (D2O) ON THE CELL' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 19, 9 November 1981, Columbus, Ohio, US; abstract no. 164216n, see abstract & STUD.BIOPHYS. vol. 84, no. 1 , 1981 pages 69 - 70 U.LEMM ET AL. 'STABILIZATION OF BIOCHEMICALLY ACTIVE PROTEINS BY HEAVY WATER' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 5, 3 August 1981, Columbus, Ohio, US; abstract no. 37552u, see abstract & EUR.J.BIOCHEM. vol. 116, no. 3 , 1981 pages 441 - 445 U.LEMM ET AL. 'STABILIZATION OF ENZYMES AND ANTISERUMS BY HEAVY WATER' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 1, 7 July 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 2787z, see abstract & DOKL.AKAD.NAUK.SSSR vol. 220, no. 6 , 1975 pages 1445 - 1448 V.YA.ALEKSANDROV ET AL. 'EFFECT OF HEAVY WATER (WATER-D2) ON THE RESISTANCE OF PROCOLLAGEN TO THERMAL DENATURATION AND TO THE ACTION OF COLLAGENASE' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 80, no. 23, 10 June 1974, Columbus, Ohio, US; abstract no. 130872y, see abstract & PROC.NAT.ACAD.SCI. USA vol. 71, no. 2 , 1974 C.S.PITTENDRIGH ET AL. 'VERY RAPID ENHANCEMENT BY DEUTERIUM OXIDE OF THE TEMPERATURE-TOLERANCE OF ADULT DROSOPHILA' ---	1-12
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No

PCT/FR 94/00296

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 23, 8 December 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 110159g, see abstract & NUCL.SCI.ABSTR. vol. 23, no. 12 , 1969 page 22242 K.JUNG 'EFFECT OF HEAVY WATER ON THE THERMAL RESISTANCE OF MICROORGANISMS' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 72, no. 15, 13 April 1970, Columbus, Ohio, US; abstract no. 76039b, see abstract & J. HYG. vol. 67, no. 4 , 1969 pages 679 - 690 P.R.M.STEELE ET AL. 'FACTORS AFFECTING THE VIABILITY OF FREEZE THAWED T4 BACTERIOPHAGE.II.INFLUENCE OF CERTAIN ELECTROLYTES ON THE DEGREE OF INACTIVATION.' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 21, 26 May 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 94238d, see abstract & BIOFIZIKA vol. 14, no. 1 , 1969 pages 186 - 187 Y.B.POPOV ET AL. 'EFFECT OF DEUTERIUM OXIDE ON THE HEAT RESISTANCE OF STAPHYLOPHAGE.' -----	1-12

Information on patent family members

PCT/FR 94/00296

03-08-89
25-01-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. ...de Internationale No

PCT/FR 94/00296

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 A61K47/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 332 826 (TEVA) 20 Septembre 1989 voir le document en entier	1-12
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 4, 27 Janvier 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 28099b, voir abrégé & Z.NATURFORSCH. vol. 46, no. 9-10 , 1991 pages 789 - 793 C.HEYDE ET AL. 'HEAVY WATER (D2O) PROTECTIVE EFFECT ON PROTEINS IN PHARMACEUTICALS.FOR EXAMPLE:HUMAN CHOLINESTERASE' --- -/--	1-12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 Mai 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scarponi, U

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 17, 27 Octobre 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 148271w, voir abrégé & TSITOLOGIYA vol. 28, no. 8 , 1986 pages 790 - 795 V.YA.ALEKSANDROV 'STABILIZING EFFECT OF HEAVY WATER (D2O) ON THE CELL' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 19, 9 Novembre 1981, Columbus, Ohio, US; abstract no. 164216n, voir abrégé & STUD.BIOPHYS. vol. 84, no. 1 , 1981 pages 69 - 70 U.LEMM ET AL. 'STABILIZATION OF BIOCHEMICALLY ACTIVE PROTEINS BY HEAVY WATER' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 5, 3 Août 1981, Columbus, Ohio, US; abstract no. 37552u, voir abrégé & EUR.J.BIOCHEM. vol. 116, no. 3 , 1981 pages 441 - 445 U.LEMM ET AL. 'STABILIZATION OF ENZYMES AND ANTISERUMS BY HEAVY WATER' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 1, 7 Juillet 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 2787z, voir abrégé & DOKL.AKAD.NAUK.SSSR vol. 220, no. 6 , 1975 pages 1445 - 1448 V.YA.ALEKSANDROV ET AL. 'EFFECT OF HEAVY WATER (WATER-D2) ON THE RESISTANCE OF PROCOLLAGEN TO THERMAL DENATURATION AND TO THE ACTION OF COLLAGENASE' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 80, no. 23, 10 Juin 1974, Columbus, Ohio, US; abstract no. 130872y, voir abrégé & PROC.NAT.ACAD.SCI. USA vol. 71, no. 2 , 1974 C.S.PITTENDRIGH ET AL. 'VERY RAPID ENHANCEMENT BY DEUTERIUM OXIDE OF THE TEMPERATURE-TOLERANCE OF ADULT DROSOPHILA' ---	1-12
	--- -/--	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 23, 8 Décembre 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 110159g, voir abrégé & NUCL.SCI.ABSTR. vol. 23, no. 12 , 1969 page 22242 K.JUNG 'EFFECT OF HEAVY WATER ON THE THERMAL RESISTANCE OF MICROORGANISMS' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 72, no. 15, 13 Avril 1970, Columbus, Ohio, US; abstract no. 76039b, voir abrégé & J. HYG. vol. 67, no. 4 , 1969 pages 679 - 690 P.R.M.STEELE ET AL. 'FACTORS AFFECTING THE VIABILITY OF FREEZE THAWED T4 BACTERIOPHAGE.II.INFLUENCE OF CERTAIN ELECTROLYTES ON THE DEGREE OF INACTIVATION.' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 21, 26 Mai 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 94238d, voir abrégé & BIOFIZIKA vol. 14, no. 1 , 1969 pages 186 - 187 Y.B.POPOV ET AL. 'EFFECT OF DEUTERIUM OXIDE ON THE HEAT RESISTANCE OF STAPHYLOPHAGE.' -----	1-12

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR 94/00296

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)